

Трещалин Михаил Иванович

**Фармакологические свойства нового противоопухолевого
мультитаргетного препарата антрафуран**

14.03.07 – Химиотерапия и антибиотики

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва, 2022 г.

Работа выполнена в лаборатории фармакологии и химиотерапии Федерального Государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

- Научный руководитель:** **Переверзева Элеонора Рафаиловна**
доктор биологических наук, зам. директора по научной работе, зав. лабораторией фармакологии и химиотерапии ФГБНУ «НИИНА»
- Официальные оппоненты:** **Горбунова Вера Андреевна**
доктор медицинских наук, профессор, главный научный консультант химиотерапевтического отделения N1 отдела лекарственного лечения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
- Островская Лариса Анатольевна**
доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории количественной онкологии ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН
- Ведущая организация:** ФГБУ «НМИЦ Радиологии» Минздрава России

Защита диссертации состоится 2 марта 2022 года в 14:00 на заседании диссертационного совета Д 001.005.01 при ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе» по адресу: 119021, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д.11, стр. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе» по адресу: 119021, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д.11, стр. 1 и на сайте организации: <https://www.gause-inst.ru/>

Автореферат разослан « » 2022 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Ефременкова Ольга Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В последние десятилетия возможности лечения злокачественных опухолей значительно расширились. Существенно пополнился арсенал противоопухолевых лекарств [Переводчикова и др., 2013, Горбунова, 2013]. Наряду с классическими противоопухолевыми препаратами в клинической практике стали широко использовать биотерапевтические средства, направленные на определенные молекулярные мишени, позволяющие контролировать рост опухолей [Новик, 2018]. Применение таких молекулярно-нацеленных или «таргетных» препаратов привело к изменению структуры смертности от онкологических заболеваний, уменьшению удельного веса локализаций с высоким уровнем летальности (рак пищевода, желудка, колоректальный рак, немелкоклеточный рак легкого и др.) и увеличению медианы выживаемости больных [Мерабишвили, 2019, Каприн и др., 2018].

Однако, даже высокоизбирательное воздействие на опухоль таких таргетных препаратов, как моноклональные антитела, может вызывать нежелательные явления [Новик, 2018]. Трудность их контроля, как правило, определяется независимостью от дозы иммунотерапевтического средства. В таких случаях требуется изменение лечебной тактики и возврат к классической химиотерапии [Давыдов и др., 2017]. Часть биологических агентов обладает способностью потенцировать противоопухолевую активность химиотерапевтических веществ, но достижение максимально возможного лечебного эффекта от комбинированного воздействия нередко ограничивается токсическими свойствами цитостатиков.

Прорывные успехи в совершенствовании методов органической и медицинской химии, наряду с установлением молекулярных мишеней ингибирования опухолевого роста, сыграли существенную роль в развитии противоопухолевой химиотерапии. Они позволили направленно синтезировать практически любые вещества, и открыли возможность разработки новых поколений противоопухолевых препаратов с улучшенными терапевтическими свойствами [Давыдов и др., 2017]. В настоящее время многими исследователями проводятся различные химические модификации высокоэффективных препаратов с целью снижения токсичности и обхода лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Появляются новые поколения антрациклиновых антибиотиков и их синтетических аналогов - антрацендионов, применяемых во многих схемах химиотерапии. Так, в ФГБНУ «НИИНА» в результате направленного поиска противоопухолевых веществ в ряду в ряду гетероаренантрацендионов было синтезировано производное антра[2,3-b]фуран-3-карбоксамид (антрафуран), способное подавлять рост опухолевых клеток различного гистогенеза, включая линии с множественной лекарственной устойчивостью [Shchekotikhin

et al., 2016, Tikhomirov et al., 2018, Volodina et al., 2019]. Исследования показали, что Антрафуран обладает способностью к одновременному ингибированию нескольких мишеней, важных для опухолевого роста - топоизомераз I и II, а также ряда серин-треониновых протеинкиназ, включая AurB, AurC, Pim1, Pim3, т.е. оказывает мультитаргетное действие на опухолевые клетки. Соединение продемонстрировало значимую терапевтическую эффективность *in vivo* как при парентеральном, так и при пероральном пути введения [Shchekotikhin et al., 2016].

В настоящее время около 30% противоопухолевых препаратов применяют перорально, включая многие биотерапевтические средства [Гилман и др., 2006], алкилирующие агенты, противоопухолевые антибиотики. Этот путь введения улучшает качество жизни больных и позволяет сократить время их пребывания в клинике. [Decision Resources Survey, 2005].

Учитывая тенденции развития современной противоопухолевой химиотерапии, представляется чрезвычайно актуальной разработка мультитаргетного противоопухолевого препарата для перорального применения, обладающего способностью преодолевать лекарственную устойчивость опухолевых клеток.

Степень разработанности. К настоящему времени накоплено достаточно много данных относительно изучения новых антрациклинов и антрацендионов с улучшенными терапевтическими свойствами. В предклинических и клинических исследованиях оценивается следующее поколение препаратов этого класса [Nadas et al., 2006, Arcamone, 2008, Yamamoto et al., 2009, Cookson et al., 2014, Marczak et al., 2015]. Поскольку в качестве терапевтических мишеней этих антибиотиков признаны топоизомеразы человека I и II и две их изоформы hTop1 и hTop2, то изучено большое количество ингибиторов различных изоформ этих ферментов. Большинство их находится в стадии разработки [Vicker et al., 2002, Amin et al., 2018].

В доступной литературе отсутствуют данные о получении и изучении субстанций и лекарственных форм производных антрацендионов, обладающих высокой противоопухолевой активностью, а также отсутствуют зарегистрированные лекарственные средства для перорального применения, содержащие в качестве действующего вещества субстанцию антрацендиона, за исключением митоксантрона – синтетического цитостатического препарата, ингибитора топоизомеразы II.

Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы явилось фармакологическое изучение субстанции и лекарственной формы метансульфоната (S)-3-[(3-амино-1-пирролидинил)карбонил]-4,11-дигидрокси-2-метилантра[2,3-b]фуран-5,10-диона (антрафуран, ЛХТА-2034).

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительную оценку противоопухолевой активности и параметров острой токсичности антрафурана при различных путях введения;
2. В исследовании на моделях опухолей мышей и человека изучить основные терапевтические характеристики эффективности и переносимости антрафурана в пероральной лекарственной форме;
3. Изучить субхроническую токсичность субстанции антрафурана при пероральном пути введения;
4. Определить токсикологические характеристики антрафурана в лекарственной форме при пероральном применении.

Научная новизна. Впервые получены данные об эффективности и безопасности антрафурана - оригинального препарата нового класса противоопухолевых средств, созданного на основе антра[2,3-b]фуран-3-карбоксамиды.

Впервые экспериментально доказано, что антрафуран – синтетический аналог классических цитотоксических антрациклиновых антибиотиков – при наличии полифармакологического (мультицелевого) механизма действия не имеет лимитирующих видов токсичности.

Впервые установлена зависимость эффективности и переносимости антрафурана от пути введения.

Впервые при различных путях введения определен диапазон переносимых и токсических доз антрафурана, установлены причины гибели животных при передозировках.

Впервые на различных моделях перевиваемых опухолей мышей и человека установлен диапазон терапевтических доз и режим введения лекарственной формы антрафурана для перорального применения.

Впервые при изучении субхронической токсичности субстанции и лекарственной формы антрафурана определен спектр функциональных и морфологических изменений органов и тканей, установлена их зависимость от дозы и обратимость токсического действия.

Впервые выявлена способность антрафурана к преодолению гематоэнцефалического барьера.

Научное значение проведенного исследования состоит в демонстрации возможности создания синтетических аналогов антрациклина с высокой терапевтической эффективностью, основанной на мультицелевом механизме действия, и удовлетворительной переносимостью, улучшенной по сравнению с антрациклиновыми антибиотиками.

Параметры фармакодинамических эффектов антрафурана, полученные на адекватных опухолевых моделях, представляют собой основу для разработки и оптимизации лекарственных средств на основе антрахинонов.

Результаты проведенного исследования позволят уточнить стратегию последующего доклинического и клинического исследования препаратов близкой структуры и механизма действия.

Практическая значимость работы. Завершено предклиническое изучение препарата антрафуран в качестве противоопухолевого средства для перорального применения. Установлены особенности его побочного действия. Определены вероятные токсические реакции при передозировках. Полученные терапевтические и токсикологические характеристики антрафурана будут востребованы при формировании программы клинических испытаний.

Высокая противоопухолевая активность антрафурана при внутрибрюшинном пути введения указывает на возможность его применения для региональной химиотерапии при первичных опухолях брюшины (мезотелиомы, псевдомиксомы), а также при перитонеальном карциноматозе, обусловленном метастазированием колоректального рака, рака яичников, аппендикса, карциномы поджелудочной железы, желудка.

Проникновение препарата через гематоэнцефалический барьер при пероральном введении открывает перспективу его использования для лечения опухолей мозга.

Методы исследования. В работе использованы стандартные токсикологические, гематологические, биохимические, патоморфологические методы исследования. Противоопухолевая активность субстанции и лекарственных форм антрафурана оценивалась с применением методов экспериментальной онкологии на моделях перевиваемых опухолей мышей и ксенографтах опухолей человека.

Положения, выносимые на защиту

1. Количественные показатели острой токсичности и механизм гибели животных существенным образом зависят от пути введения антрафурана. Многократное снижение параметров острой токсичности антрафурана при пероральном введении создает возможность для поиска оптимальных эффективных доз и режимов применения препарата.

2. Антрафуран высоко эффективен при многократном пероральном введении в широком диапазоне доз. Схема с ежедневным 5-кратным курсом и разовой дозой 80 мг/кг является оптимальной по кратности и длительности введения иммунокомпетентным мышам с перевиваемыми опухолями.

3. Антрафуран, примененный в пероральной лекарственной форме, достоверно и значимо ингибирует рост подкожно привитых ксенографтов рака молочной железы человека

T47D на уровне T/C=38–42% в режиме 5-кратного введения с интервалом 48 часов в разовой дозе 80 мг/кг, близкой к МПД для мышей Balb/c nude.

4. Функциональные и морфологические изменения, возникающие под действием антрафурана, зависят от величины примененной дозы. При курсовом введении препарата в дозе, эквивалентной 1 терапевтической, они полностью обратимы в течение 30 дней.

5. Особенностью токсического действия антрафурана является его способность проникать через гематоэнцефалический барьер. Она проявляется морфологически только при многократном использовании высокой дозы соединения.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 14.03.07 – Химиотерапия и антибиотики, а именно пункту 7 «Изучение токсикологических, фармакологических, фармакокинетических и фармакодинамических свойств, иммуномодулирующего действия химиотерапевтических препаратов в эксперименте».

Личный вклад автора. Автором был проведен обзор актуальной литературы, составлен план исследований, проведена основная часть экспериментальных работ, представленных в диссертации, проанализированы полученные результаты и подготовлены материалы для публикации. Постановка экспериментов на моделях перевиваемых опухолей мышей и ксенографтах опухолей человека осуществлялась в сотрудничестве с НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов обоснована использованием достаточного количества животных в экспериментальных группах, выбором адекватных контролей, использованием современных методов исследований и оборудования, а также статистической обработкой данных.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях: XV Всероссийской научно-практической конференции имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы» (Москва, 2018 г.), XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 2017 г.), XXXVIII Международной научно-практической конференции EurasiaScience, XXXVIII Международной научно-практической конференции Advances in science and technology.

Результаты работы были включены в Патент РФ №2639479 «Пероральные противоопухолевые средства и способ лечения онкологических заболеваний», а также в Отчет о выполнении проекта «Разработка экспериментального образца пероральной лекарственной формы оригинального мультитаргетного противоопухолевого

антрафурандиона», выполненного в рамках Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий».

Апробация диссертации была проведена на Ученом совете ФГБНУ «НИИНА», протокол № 7 от 07 декабря 2021 года.

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 9 статей, из них 5 - в изданиях, индексируемых в базах данных Scopus/Web of Science, и 4 - в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 4 тезисов в сборниках.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 141 странице текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 22 таблицами, 20 рисунками и 34 микрофотографиями. Список использованной литературы включает 165 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Изучение эффективности и безопасности антрафурана при парентеральном введении

Изучение эффективности антрафурана проводилось на мышах с внутрибрюшинно (в/б) перевитым лимфолейкозом Р388 в диапазоне доз от 10 до 50 мг/кг. При ежедневном пятикратном в/б введении субстанции препарата в дозах от 10 до 30 мг/кг было зарегистрировано достоверное увеличение средней продолжительности жизни (СПЖ) мышей с лимфолейкозом Р388 (Т/С=170-214%). В сравнительном эксперименте при в/б применении субстанции и лекарственной формы (ЛФ) препарата был получен идентичный ответ: Т/С=242% против Т/С=243% при отсутствии лейкозного асцита у всех мышей. Переносимость в обоих случаях была удовлетворительной, гибели от токсичности не наблюдали (рис. 1а, 1б).

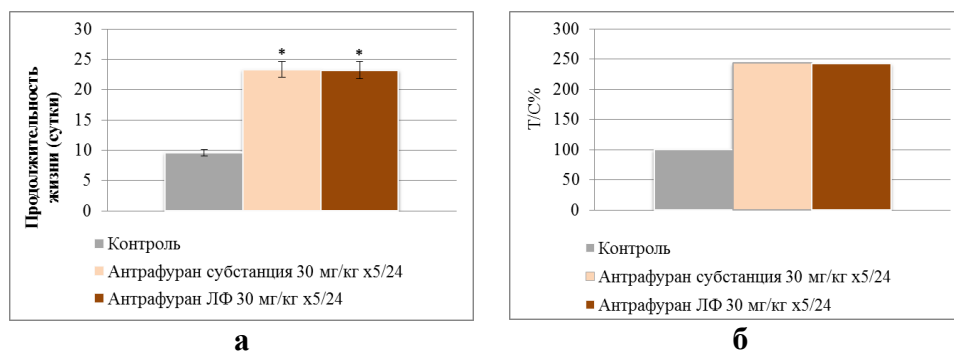


Рисунок 1 – Средняя продолжительность жизни (а) и Т/С% (б) мышей с лимфолейкозом Р-388 после внутрибрюшинного введения субстанции и лекарственной формы антрафурана. Для планок погрешностей использовано стандартное отклонение. *Различия с контролем достоверны при $p \leq 0,05$.

Оценка острой токсичности субстанции и лекарственной формы антрафурана на мышах и крысах при внутрибрюшинном введении. Для исследования острой токсичности 0,2% раствор субстанции антрафурана в 5% растворе глюкозы вводили мышам BDF₁ в диапазоне доз от 20 до 70 мг/кг. В/б введение высоких смертельных доз субстанции антрафурана приводило к гибели животных в течение от 1 часа до 1 суток после введения. Результаты вскрытия павших животных позволяют предположить, что причиной смерти является сердечно-сосудистая недостаточность, вызванная нейротоксическим действием. Расчет доз, характеризующих токсичность, производили при помощи компьютерной программы «StatPlus-2006». Расчётные дозы для субстанции антрафурана, введенной в/б, для мышей составили ЛД₅₀=52,5(47,1÷57,9) мг/кг; МПД(~ЛД₁₀)=39,4(35,8÷43,3) мг/кг (В скобках указан расчетный диапазон варьирования доз).

Определение параметров острой токсичности ЛФ препарата при в/б применении проводилось в диапазоне доз от 40 до 85 мг/кг. Клиническая картина интоксикации и гибели мышей была такой же, как для субстанции. Расчётные токсические дозы ЛФ составили ЛД₅₀=64,6(56,1÷72,5)мг/кг; МПД(~ЛД₁₀)=47,6(45,3÷49,9) мг/кг. Широта токсического действия субстанции и ЛФ различалась, практически, вдвое. Разница между нижней границей ЛД₅₀ и МПД для субстанции составила 8 мг/кг, а для лекформы - 15 мг/кг.

Изучение острой токсичности ЛФ антрафурана на крысах при внутрибрюшинном введении показало, что клиническая картина интоксикации, проявившаяся при определении токсических доз на мышах, характерна и для крыс. Для крыс ЛД₅₀=68,3(62,1÷75,1) мг/кг; МПД(~ЛД₁₀)=47,2(45,3÷49,9) мг/кг, при этом широта токсического действия была весьма невелика.

Таким образом, токсичность лекарственной формы антрафурана при внутрибрюшинном введении для мышей и крыс оказалась практически одинаковой, о чем свидетельствуют близкие величины ЛД₅₀ и МПД.

Оценка острой токсичности и эффективности субстанции и лекарственной формы антрафурана на мышах и крысах при внутривенном введении. Внутривенное введение антрафурана в виде субстанции в высоких смертельных дозах вызывало гибель мышей «на игле» или в течение 10 – 15 минут после введения. Более низкие дозы препарата приводили к гибели животных в течение первых суток. Данные вскрытия позволяют предположить, что причиной смерти животных является сердечно-сосудистая недостаточность, вызванная нейротоксическим действием.

Клиническая картина интоксикации и гибели при внутривенном введении лекарственной формы антрафурана крысам была такой же, как у мышей.

Высокие смертельные дозы субстанции и лекарственной формы препарата при внутривенном введении и у мышей, и у крыс оказались существенно ниже, чем при внутрибрюшинном применении. Расчётные токсические дозы для субстанции на мышах составили $LD_{50}=5,9(4,8\div 6,9)$ мг/кг, МПД($\sim LD_{10}$)= $3,56(3,1\div 4,2)$ мг/кг, для ЛФ на крысах - $LD_{50}=17,1(16,1\div 18,0)$ мг/кг, МПД($\sim LD_{10}$)= $15,3(14,5\div 15,9)$ мг/кг. Как видно из приведенных значений, верхняя граница переносимых доз практически совпадает с нижней границей летальных.

Для изучения эффективности антрафурана при внутривенном применении препарат вводили однократно в диапазоне доз, не превышающих МПД для данного пути введения мышам с перевитым внутрибрюшинно лимфолейкозом Р388. Полученные результаты показали, что внутривенное применение препарата в диапазоне доз, не превышающих МПД, неэффективно: СПЖ в группах антрафурана составила 12-13 суток, а в группе контроля - 12,7 суток.

Таким образом, в/в путь введения антрафурана был отвергнут. Поскольку для антрациклинов эффективность перорального применения уже была доказана на примере близкого к антрафурану по структуре препарата идарубицин, этот путь введения был выбран для продолжения доклинических исследований.

2. Изучение эффективности и безопасности антрафурана при пероральном введении

Лимфолейкоз Р388. При оценке эффективности антрафурана на Р388 было показано, что пероральное применение препарата в диапазоне разовых доз 40–60–80–100 мг/кг 5-кратно ежедневно высокоэффективно и зависит от величины дозы (рис. 2). Соответственно, СПЖ= $13,2\pm 0,52$ – $16,0\pm 1,414$ – $22,6\pm 4,033$ – $21,2\pm 6,26$ суток против группы КРО, где СПЖ= $10,5\pm 1,3$ суток (Т/С=100%).

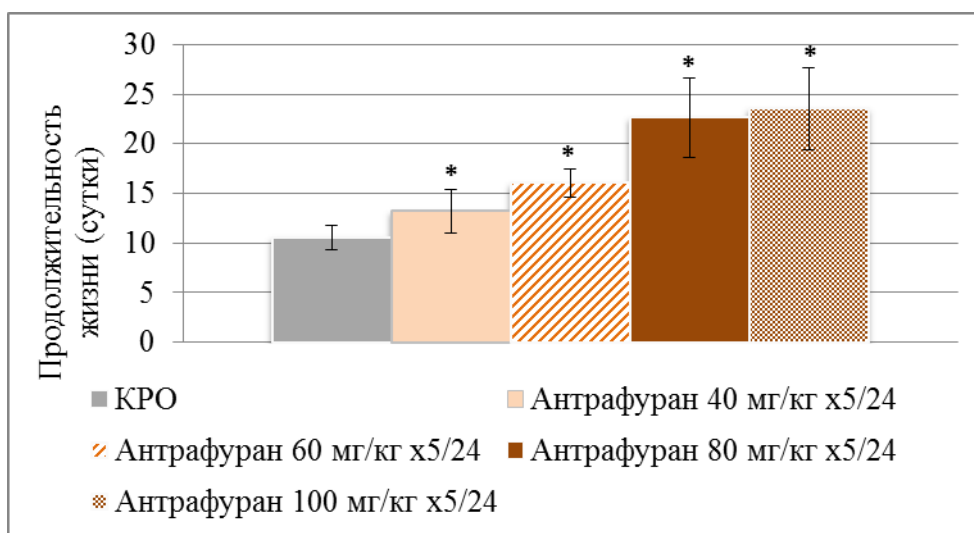


Рисунок 2 – Средняя продолжительность жизни мышей при ежедневном 5-кратном (2-6 сутки) пероральном введении антрафурана мышам с внутрибрюшинно привитым

лимфолейкозом Р388 в диапазоне доз. Для планок погрешностей использовано стандартное отклонение. *Различия с контролем достоверны, $p \leq 0,05$.

Увеличение выживаемости мышей достигало Т/С=126 – 152 – 215 – 224% ($p < 0,05$ от группы КРО). Достоверных различий между группами, получавшими терапию в разовых дозах 80 и 100 мг/кг, не выявлено. При 5-кратном курсе разовая доза 80 мг/кг (суммарно 400 мг/кг) была переносимой и наиболее эффективной, а разовая доза 100 мг/кг (суммарно 500 мг/кг) вызвала единичную гибель мышей.

Контроль воспроизводимости противоопухолевого эффекта был выполнен с переносимыми эффективными разовыми дозами 60 и 80 мг/кг (суммарно 300 и 400 мг/кг). В результате был получен достоверный противоопухолевый эффект с достижением СПЖ=16,8±3,24 дня и СПЖ=20,8±0,9 дня против СПЖ=9,3±0,52 в группе КРО. Соответственно, Т/С=181 и 223% ($p < 0,05$) (рис. 3а, б). Лекарственной гибели мышей не наблюдали.

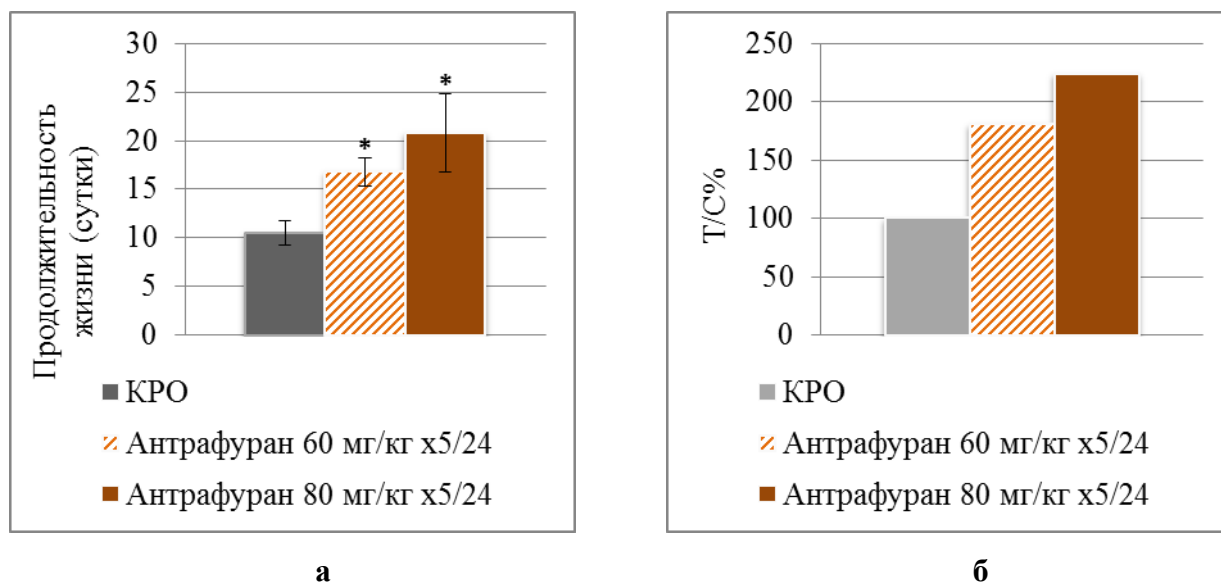


Рисунок 3 - Средняя продолжительность жизни мышей с внутрибрюшинно привитым лимфолейкозом Р388 при ежедневном 5-кратном (2-6 сутки) пероральном введении антрафурана в диапазоне доз. Для планок погрешностей использовано стандартное отклонение. *Различия с контролем достоверны, $p \leq 0,05$.

Рассчитанная по соотношению максимальной и минимальной эффективных доз терапевтическая ширина составила 5:1.

Отработка оптимальной схемы перорального применения антрафурана была выполнена при 5-ти или 8-кратном ежедневном введении с использованием оптимальной разовой дозы 80 мг/кг, введенной с интервалами 24 или 48 часов.

Было апробировано 3 схемы: 80 мг/кг 5-кратно через 24 ч (суммарно 400 мг/кг); 80 мг/кг 5-кратно через 48 ч (суммарно 400 мг/кг); 80 мг/кг 8-кратно через 48 ч (суммарно 640 мг/кг). Показано, что в пределах суммарных доз 400–640 мг/кг уровень эффекта антрафурана был достоверно равновысоким и не зависел от кратности введения или суммарной дозы: СПЖ=18,4±1,74, СПЖ=18,4±2,12 и СПЖ=17,4±2,19 суток против СПЖ=9,7±0,92 в группе КРО ($p < 0,05$) (рис. 4). Соответственно, увеличение выживаемости достигало Т/С%=190–190–179% без достоверных различий между схемами.

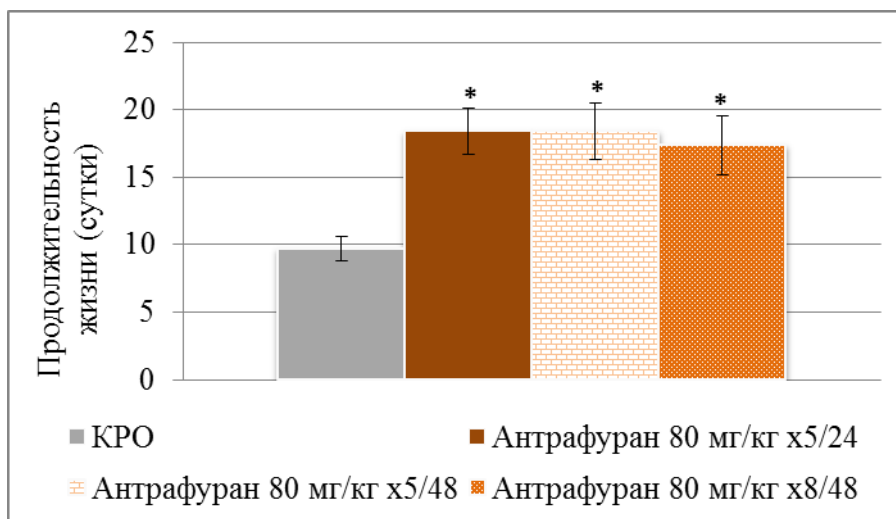


Рисунок 4 - Средняя продолжительность жизни при различных схемах перорального введения антрафурана мышам с внутрибрюшинно привитым лимфолейкозом Р388. Для планок погрешностей использовано стандартное отклонение. *Различия с контролем достоверны, $p \leq 0,05$.

В качестве оптимального режима перорального введения для изучения спектра противоопухолевого действия был отобран минимально достаточный ежедневный 5-кратный курс с оптимальной терапевтической разовой дозой.

Эпидермоидная карцинома легкого Льюис (LLC). Для солидной мышинной модели использована хорошо охарактеризованная разовая доза 80 мг/кг. Изучение выполнено на мышах с п/к трансплантированным LLC ($n=13$ в каждой группе). Антрафуран в оптимальной разовой дозе 80 мг/кг вводили ежедневно перорально на 3–7 сутки после трансплантации опухоли. Показано, что через 4 дня после окончания лечения (10-е сутки роста LLC) пальпируемые опухоли отсутствовали у 7 из 13 мышей, в то время как в группе КРО животные были с опухолями. У мышей с опухолями, появившимися одновременно с группой КРО (4-е, 8-е и 13-е сутки после лечения), объемы опухолевых узлов были достоверно меньше контрольных (рис. 5).

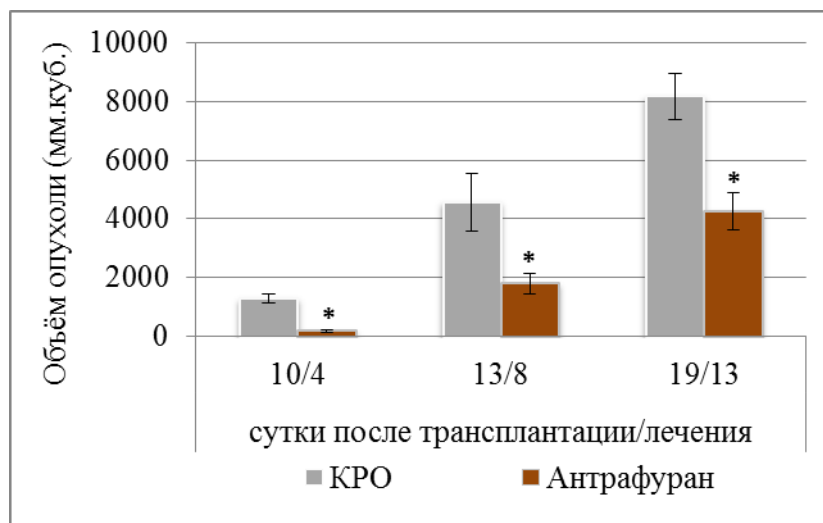


Рисунок 5 – Изменение объема опухолевых узлов солидной карциномы легкого Льюис под действием антрафурана, введенного перорально в оптимальной схеме. Для планок погрешностей использована стандартная ошибка. *Различия с контролем достоверны, $p \leq 0,05$

Расчет показателей эффективности с учетом отсутствия опухоли после окончания лечения («полная ремиссия», ПР) представлен в таб. 1. Как видно, у мышей с опухолями, выросшими одновременно с группой КРО, противоопухолевый эффект был значимым, достоверным и составил соответственно срокам наблюдения ТРО=84 – 61 – 48% ($p < 0,05$). ПР=54% регистрировался на значимом уровне сразу после окончания лечения более чем у половины мышей.

Таблица 1. Эффективность антрафурана, введенного перорально в оптимальной схеме, в отношении эпидермальной карциномы легкого Льюис.

Сутки после трансплантации/лечения											
10/4				14/8				19/13			
ТРО%	n	ПР%	n	ТРО%	n	ПР%	n	ТРО%	n	ПР%	n
85	6/13	54	7/13	61	10/13	23	3/13	48	12/13	1	11/13

Примечание: n – число мышей с опухолью/число мышей в группе.

Таким образом, в рамках скрининга, выполненного на прогностически значимых опухолевых моделях P388 и LLC, показано, что антрафуран при многократном пероральном введении в широком диапазоне доз (соотношение максимальной и минимальной доз 5:1) высоко и достоверно эффективен. Диапазон терапевтических (переносимых) разовых доз, при ежедневном введении или введении через день, составляет 40–100 мг/кг. Эффективность воспроизводима. Оптимальной по кратности и длительности введения мышам с перевиваемыми опухолями оказалась схема с ежедневным 5-кратным курсом, а оптимальной разовой дозой 80 мг/кг. Схемы с интервалом 48 ч между введениями или с 8-кратным курсом равноэффективны.

Эффективность антрафурана на модели рака молочной железы человека T47D при пероральном применении. Для проведения сравнительного исследования субстанции и лекарственной формы антрафурана на ксенографтах рака молочной железы человека T47D, привитых подкожно, был выбран режим 5-кратного введения с интервалом 48 часов в разовой дозе 80 мг/кг. Такая схема с введением агента в течение первых 10-ти дней роста опухоли (2–10 суток) позволяет максимально перекрыть выход опухоли в фазу экспоненциального роста опухоли (5–16 с) и контролировать ее активную стадию. Пероральное введение субстанции антрафурана в испытанной дозе и режиме оказало слабый кратковременный, ниже порогового, но достоверный ингибирующий эффект, T/Cmin=56% ($p < 0,0002$) без побочных осложнений или гибели мышей от токсичности (рис. 6а).

Эффективность ЛФ антрафурана была значимой и достоверной. На 7-е сутки после окончания курса введений размеры опухолей были меньше, чем в контроле, соответственно $V_{cp} = 957 \pm 442 \text{ мм}^3$ против $V_{cp} = 2525 \pm 1034 \text{ мм}^3$, T/C=38% (Tтест=0,002). Эффект удерживался на значимом уровне в течение недели до T/C=42% (Tтест=0,12) (рис. 6б).

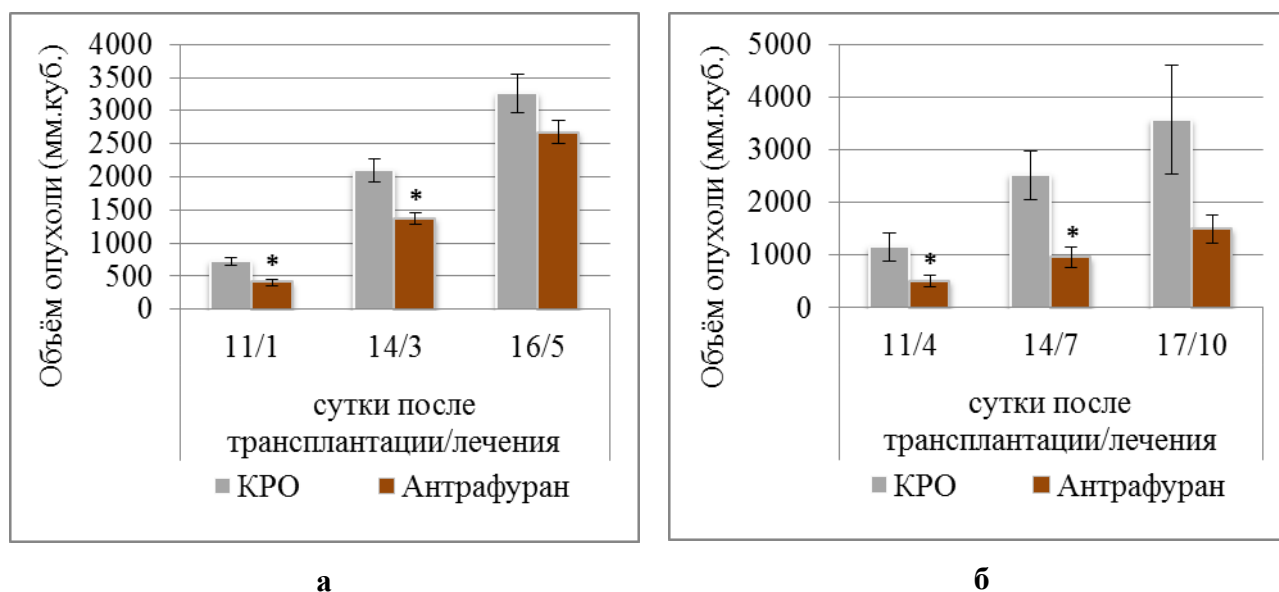


Рисунок 6 – Динамика роста подкожных ксенографтов рака молочной железы человека T47D после 5-кратного перорального введения субстанции (а) и лекарственной формы (б) антрафурана в разовой дозе 80 мг/кг с интервалом 48 часов. Для планок погрешностей использована стандартная ошибка. *Различия с контролем достоверны, $p \leq 0,05$

Таким образом, по результатам исследований на опухолевых моделях мышей и человека антрафуран (субстанция и лекформа) охарактеризован как эффективный противоопухолевый препарат, перспективный для перорального применения.

Острая токсичность лекарственной формы при пероральном введении. При пероральном применении ЛФ антрафурана гибель животных наступала, в основном, на 3-5

сутки на фоне явлений кишечной токсичности (диспепсия, снижение массы тела) и 7-10 суток, что характерно для гематологической токсичности. Расчётные токсические дозы для мышей составили: $LD_{50}=306,7(209,1\div 404,3)$ мг/кг; $MПД(\sim LD_{10})=128,9(115,7\div 142,1)$ мг/кг, а для крыс: $LD_{50}=353,6(253,2\div 457,7)$ мг/кг; $MПД(\sim LD_{10})=171,7(122,9\div 220,5)$ мг/кг.

При пероральном пути введения токсичность препарата по параметрам LD_{50} и МПД уменьшается в 3-5 раз по сравнению с внутривенным. Изменяются механизмы и сроки гибели животных: пероральное применение вызывает гибель мышей и крыс от 3 до 10 суток при явлениях гастроинтестинальной и гематологической токсичности, в отличие от внутривенного пути введения, когда гибель наступает в течение 1 суток на фоне сердечно-легочной недостаточности, обусловленной нейротоксичностью препарата. Все это позволяет оценить пероральный путь введения как оптимальный и продолжить углубленные токсикологические исследования антрафурана в качестве потенциального противоопухолевого средства в виде лекарственной композиции для приема внутрь.

3. Субхроническая токсичность антрафурана на крысах при пероральном применении

При проведении исследований на крысах субстанцию антрафурана вводили в желудок при помощи шприца со специальным металлическим зондом ежедневно на протяжении 15 дней в разовых дозах, составляющих 20 мг/кг (1 терапевтическая доза) и 100 мг/кг (5 терапевтических доз). При расчете разовых доз для крыс исходили из терапевтических доз для мышей, пересчитанных через коэффициент поверхности тела.

Введение препарата в разовой дозе, составляющей 1 терапевтическую, хорошо переносилось животными и не вызывало их гибели. Они нормально прибавляли в массе тела. Превышение терапевтической дозы (ТД) в 5 раз приводило к гибели части животных. К окончанию курса введений антрафурана в разовой дозе, составляющей 5 ТД, было отмечено замедление прироста массы тела, которое сохранялось до конца наблюдения (Рис. 7).

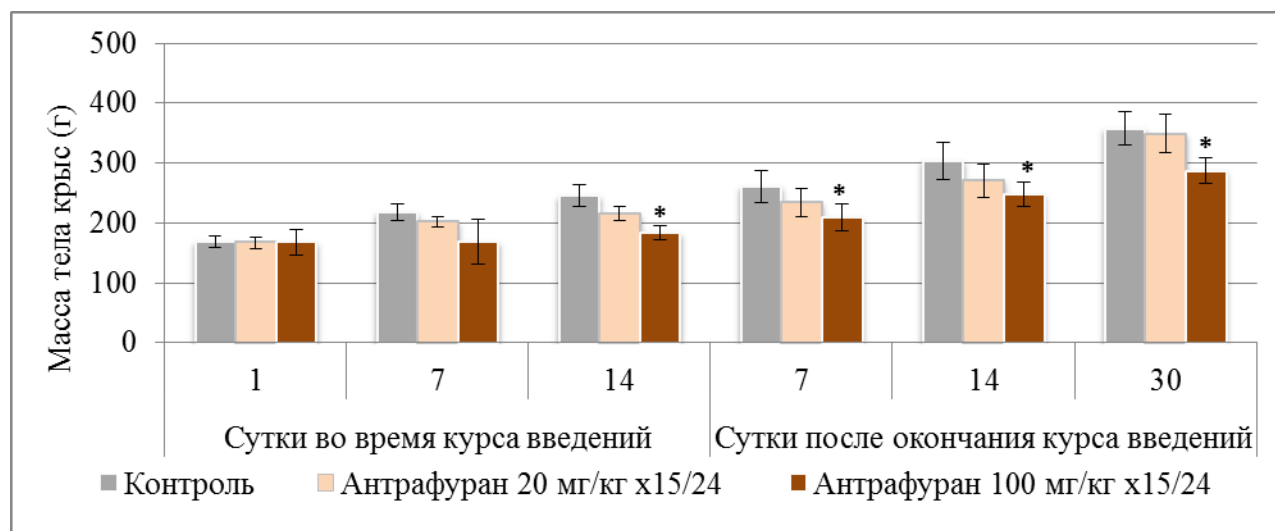


Рисунок 7 – Динамика массы тела крыс. Для планок погрешностей использована стандартная ошибка. *Различия с контролем достоверны, $p \leq 0,05$

При количественном исследовании клеток периферической крови после 14 введения антрафурана (15-е сутки курса) в дозе 100 мг/кг и через 3 дня по окончании курса было выявлено достоверное уменьшение общего количества лейкоцитов (ОКЛ) до 5 – 6 тыс/мм³ (Рис. 8). Уменьшение ОКЛ происходило за счёт лимфоцитов. Лимфоцитопения наблюдалась в те же сроки эксперимента, что и снижение общего количества лейкоцитов.

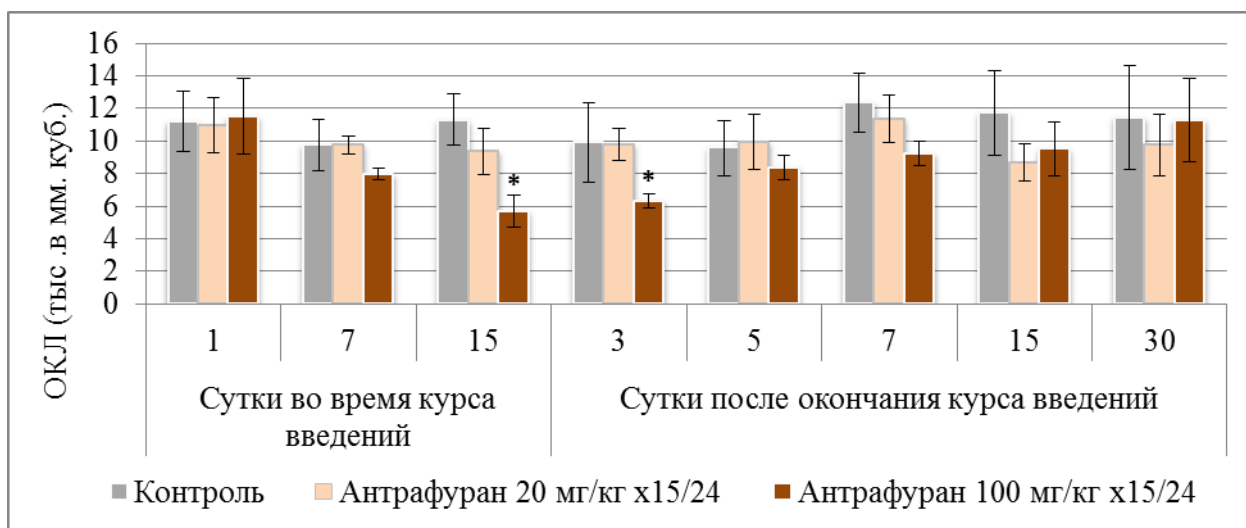


Рисунок 8 – Динамика общего количества лейкоцитов в периферической крови крыс. Для планок погрешностей использована стандартная ошибка. *Различия с контролем достоверны, $p < 0,05$

Снижение количества эритроцитов и уменьшение содержания гемоглобина было зарегистрировано после 7 введения, величины гематокрита – на 1 сутки по окончании введения препарата и сохранялось до 30 суток эксперимента. К концу наблюдения эти показатели восстанавливались до уровня интактного контроля. Количество тромбоцитов оставалось в пределах физиологической нормы. При применении препарата в дозе 20 мг/кг достоверных изменений клинической картины крови не обнаружено. При биохимическом исследовании сыворотки крови на 1 и 30 сутки после окончания введения препарата патологических изменений не выявлено. При клиническом исследовании мочи у животных, получавших антрафуран в 1 ТД, была отмечена гематурия, которая проявилась на 1 сутки после курса введения препарата. У животных, получавших высокую дозу антрафурана, в моче, помимо эритроцитов, были найдены нитраты. Гематурия и нитратурия была обнаружена сразу по окончании курса и сохранялась в течение месяца.

При изучении сердечно-сосудистой системы подопытных животных отклонений от нормы не обнаружено. Массовые коэффициенты (МК) внутренних органов животных, получавших антрафуран, не отличались от контроля, за исключением тимуса, уменьшение массы которого было выявлено в группе, получавшей препарат в дозе, равной 5ТД.

Изучение патологических изменений внутренних органов крыс под действием субстанции антрафурана показало, что препарат, примененный в разовой дозе, эквивалентной 1 ТД, вызывает морфологические изменения разной степени выраженности в печени, почках, сердце, желудке, тощей и подвздошной кишке, селезенке и тимусе. При курсовом введении препарата в дозе, превышающей терапевтическую в 5 раз, помимо перечисленных органов, повреждающему действию подвергаются также лимфоузлы, поджелудочная железа, толстая кишка и мозг.

При применении антрафурана в 1 ТД повреждение ткани печени проявлялось в виде мелких очагов некроза в различных зонах. В почках на фоне сильного периваскулярного отека встречались единичные мелкие очаги некроза извитых канальцев, которые локализовались вокруг сосудов и клубочков корковой зоны. В сердце морфологические изменения выражались в полнокровии сосудов миокарда. Реакция слизистой оболочки желудочно-кишечного канала на пероральное введение препарата проявлялась в виде гиперемии, отека и очаговой деструкции клеточных элементов поверхностных слоев. Так, в желудке отмечалось резкое полнокровие капилляров, атрофия или деструкция покровно-ямочного эпителия и обкладочных клеток, умеренная атрофия слизистой оболочки. Воздействие антрафурана на структуру селезенки выражалось в умеренной атрофии лимфоидной ткани фолликулов, тимуса – в умеренной атрофии лимфоидной ткани в корковой и мозговой зоне отдельных долек. Все эти явления были полностью обратимы в течение месяца.

Пятикратное превышение терапевтической дозы вызывало намного более глубокие повреждения в органах и тканях, а иногда изменялся и их характер. Так, в печени, наряду с некрозом ткани, был выявлен апоптоз единичных гепатоцитов. Через месяц после курса введений деструктивные изменения в печени отсутствовали, но в отдельных клетках появлялись дистрофические. При 5-кратном увеличении разовой дозы антрафурана резко усиливалось повреждающее действие препарата на ткань почек: очаги некроза канальцев возникали не только в корковой зоне, но и в других зонах почки. В отдельных клубочках юкстамедуллярной зоны появлялись очаги деструкции капилляров. В течение месяца структура почек восстанавливалась, единичные очаги деструкции подвергались организации.

Применение высокой дозы антрафурана приводило как к гемодинамическим нарушениям, так и к очаговому повреждению миокарда, приводящему у отдельных

животных через месяц после курса к атрофии небольших групп мышечных волокон. Отмечалось также усиление повреждающего действия препарата на слизистую оболочку желудочно-кишечного канала. В желудке к деструктивным изменениям покровно-ямочного эпителия присоединялась глубокая атрофия слизистой оболочки, которая сохранялась до конца наблюдения. В тощей и подвздошной кишке усиливалась гиперемия, отек и увеличивался объем ткани, подвергающейся деструкции. В течение месяца структура слизистой оболочки тощей кишки восстанавливалась, в подвздошной сохранялись признаки атрофии. Применение препарата в высокой дозе вызывало атрофию лимфоидной ткани. В лимфоузлах она была выражена умеренно. В селезенке глубокая атрофия сопровождалась активацией экстрамедуллярного кроветворения, в отдельных дольках тимуса она приобретала характер аплазии. Если структура селезенки лимфоузлов восстанавливалась полностью, то в отдельных дольках тимуса регенерация лимфоидной ткани происходила на фоне склеротических изменений стромы.

При использовании в высоких дозах препарат преодолевает гематоэнцефалический барьер, вызывая токсическую энцефалопатию, морфологические признаки которой наблюдались в сером и белом веществе больших полушарий и мозжечке.

4. Субхроническая токсичность лекарственной формы антрафурана на кроликах при пероральном применении. Антрафуран в желатиновых капсулах вводили в желудок кроликам ежедневно на протяжении 15 дней в дозах, суммарно составляющих МПД и ЛД₅₀ (разовые дозы - 2 и 6 мг/кг соответственно). Содержание препарата в капсулах рассчитывали индивидуально для каждого животного.

На протяжении эксперимента гибели животных не наблюдалось, отклонений в поведенческих реакциях не отмечалось. На один срок наблюдения (7 сутки после окончания введений препарата) в обеих подопытных группах была зафиксирована задержка прироста массы тела по сравнению с контролем. При количественном исследовании клеток периферической крови изменений не найдено ни в одной из групп. При биохимическом исследовании сыворотки крови на 1 сутки после окончания введений препарата было выявлено повышение активности АЛТ и АСТ в обеих подопытных группах. На 15 сутки после окончания курса введений отклонений от контроля не обнаружено (Таб. 1).

Таблица 1 – Активность АЛТ и АСТ в сыворотке крови кроликов.

Группа	Доза (мг/кг) и режим	АЛТ (Ед/л)	АСТ (Ед/л)
1 сутки после окончания курса			
Антрафуран	2x15/24	*100,9 ± 10,5	*126,2 ± 25,8
Антрафуран	6x15/24	*112,1 ± 27,7	*154,2 ± 3,4
контроль	-	69,3 ± 14,1	61,1 ± 13,8

15 сутки после окончания курса			
Антрафуран	2x15/24	88,9 ± 18,0	61,0 ± 15,7
Антрафуран	6x15/24	61,1 ± 12,7	46,3 ± 14,4
контроль	-	74,8 ± 7,5	80,3 ± 9,0

*Различия с контролем достоверны, $p < 0,05$. Для доверительных интервалов использована стандартная ошибка.

При исследовании клинического анализа мочи на 1 сутки после курса обнаружено увеличение содержания уробилиногена, кетонов и белка и уменьшение удельного веса мочи в обеих подопытных группах. К концу наблюдения эти показатели возвращались к уровню контроля. Электрокардиографическое исследование состояния сердечно-сосудистой системы подопытных животных отклонений от нормы не показало. У животных, получавших препарат в высокой дозе, на 1 сутки после курса было выявлено достоверное уменьшение МК тимуса и увеличение МК печени.

Изучение патологических изменений внутренних органов кроликов под действием антрафурана показало, что препарат, примененный в дозе, суммарно составляющей МПД, вызывает морфологические изменения разной степени выраженности в печени, почках, сердце и тимусе. При курсовом введении препарата в дозе, суммарно составляющей ЛД₅₀, помимо перечисленных органов, повреждающему действию подвергаются также двенадцатиперстная кишка, селезенка и лимфоузлы.

При введении антрафурана в разовой дозе 2 мг/кг в течение 15 дней (суммарная МПД) на 1 сутки после курса в печени кроликов была выявлена вакуольная дистрофия гепатоцитов вокруг центральных вен. Вблизи триад были найдены единичные мелкие очаги микронекроза, вокруг отдельных желчных протоков – умеренная лимфогистиоцитарная инфильтрация. В почках были найдены единичные очаги вакуольной дистрофии и деструкции извитых канальцев. В отдельных прямых канальцах мозговой зоны встречались гиалиновые цилиндры и клеточный детрит. В миокарде были выявлены единичные мелкие очаги токсической кардиомиопатии. К концу наблюдения структура органов не отличалась от контроля.

Пятнадцатикратное введение препарата в дозе, суммарно составляющей ЛД₅₀, вызывало намного более глубокие повреждения в органах и тканях. Так, в печени, вакуольная дистрофия гепатоцитов приобретала тотальный характер, увеличивались размеры очагов микронекроза и изменялась их локализация, появлялись признаки повреждения желчных протоков. Через 2 недели структура печени частично восстанавливалась. В почке применение антрафурана в суммарной дозе, эквивалентной ЛД₅₀, приводило к возникновению сильного периваскулярного отека в корковой и

юкстамедуллярной зоне. Во всех зонах были выявлены множественные мелкие очаги некроза или деструкции эпителия извитых и прямых канальцев. По окончании эксперимента в ткани почек были найдены обширные зоны некроза канальцев в стадии организации, которые распространялись на весь нефрон от корковой или юкстамедуллярной зоны до прямых канальцев мозговой зоны. В клубочках, прилежащих к зоне фиброза, было отмечено утолщение капсулы и очаговая атрофия капиллярной сети. На месте поврежденных канальцев формировались кисты, выстланные плоским эпителием. В миокарде под действием высокой дозы антрафурана у отдельных животных возникали очаговые изменения в виде отека и токсической кардиомиопатии. На 15 сутки по окончании введений крупные очаги отека и кардиомиопатии были обнаружены у всех животных. В двенадцатиперстной кишке применение препарата в высокой дозе вызывало очаговую атрофию эпителия ворсинок и крипт, усиление слизиобразования, в единичных случаях – некроз. В течение 2 недель структура слизистой оболочки восстанавливалась, очаги некроза подвергались организации.

Применение препарата в высоких дозах вызывало атрофию лимфоидной ткани. В лимфоузлах и селезенке она была выражена слабо. В отдельных долях тимуса умеренная атрофия лимфоидной ткани регистрировалась и в корковой, и в мозговой зоне. Если структура селезенки лимфоузлов восстанавливалась полностью, то в отдельных долях тимуса она сохранялась в течение 2 недель и сопровождалась признаками акцидентальной инволюции.

В результате проведенных клинико-лабораторных исследований удалось установить, что препарат антрафуран обладает гепато- и нефротоксическими свойствами. Гепатотоксичность препарата подтверждается повышением уровня активности трансаминаз в сыворотке крови и увеличением массового коэффициента печени подопытных животных. Признаки нефротоксичности проявляются в повышении уровня белка и уробилиногена в моче и снижении ее удельного веса. Признак гастроинтестинальной токсичности - отставание в приросте массы тела животных подопытных групп на 7 сутки после окончания введений препарата.

Данные клинико-лабораторных исследований подтвердились при патоморфологическом изучении органов и тканей кроликов. Гепатотоксичность препарата морфологически выражалась в дистрофических и деструктивных изменениях гепатоцитов, которые при достижении дозы, суммарно эквивалентной ЛД₅₀, приводили к фиброзу ткани печени. Нефротоксичность проявлялась дистрофических и деструктивных изменениях эпителия извитых и прямых канальцев. При превышении переносимых доз повреждения регистрировались уже и в клубочковой системе почек, а некротические изменения канальцев

завершались фиброзом и формированием кист. Морфологические признаки гастроинтестинальной (очаговая атрофия эпителия слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки) и гематотоксичности (атрофические изменения лимфоидной ткани селезенки, лимфоузлов и тимуса) были отмечены при передозировке препарата.

Исследование показало, что изменения функциональной активности и строения внутренних органов кроликов, возникающие под действием антрафурана, примененного перорально, зависят от величины примененной дозы. При курсовом введении препарата в дозе, суммарно эквивалентной МПД, они полностью обратимы в течение 15 дней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени накоплено достаточно много информации относительно изучения новых антрациклинов и антрацендионов с улучшенными терапевтическими свойствами. Однако, данные о мультитаргетных антрацендионах, обладающих высокой противоопухолевой активностью, в доступной литературе отсутствуют. Единственным лекарственным средством, относящимся к классу антрацендионов, многие годы остается митоксантрон.

Антрафуран, разработанный в ФГБНУ «НИИНА», - производное антра[2,3-b]фуран-3-карбоксамиды – мультитаргетный препарат, одновременно ингибирующий несколько мишеней, важных для опухолевого роста, способен подавлять пролиферацию опухолевых клеток различного гистогенеза, в том числе, обладающих множественной лекарственной устойчивостью. В ходе проведенного исследования была продемонстрирована значимая терапевтическая эффективность антрафурана как при парентеральном, так и при пероральном пути введения. Был определен диапазон переносимых и токсических доз антрафурана, установлены причины гибели животных при передозировках при различных путях введения. На различных клинически значимых моделях перевиваемых опухолей мышей и человека отработан диапазон терапевтических доз и режим введения лекарственной формы антрафурана для перорального применения. В результате были получены данные об эффективности и безопасности потенциального лекарственного средства, оценены токсические свойства субстанции и фармацевтической композиции препарата для перорального введения. При изучении субхронической токсичности субстанции и лекарственной формы антрафурана был определен спектр функциональных и морфологических изменений органов и тканей, установлена их зависимость от дозы и обратимость токсического действия.

Было доказано экспериментально, что антрафуран – синтетический аналог классического цитотоксических антрациклиновых антибиотиков – при наличии полифармакологического (мультитаргетного) механизма действия при введении внутрь не

имеет дозолимитирующих видов токсичности, т.е. диапазон эффективных доз достаточно широк, чтобы избежать ограничений по дозе и длительности применения.

Таким образом, завершено предклиническое изучение препарата антрафуран в качестве противоопухолевого средства для перорального применения. Установлены особенности его побочного действия. Определены вероятные токсические реакции при передозировках. Полученные терапевтические и токсикологические характеристики антрафурана будут востребованы при формировании программы клинических испытаний.

Высокая противоопухолевая активность антрафурана при внутрибрюшинном пути введения указывает на возможность его применения для региональной химиотерапии при перитонеальном карциноматозе, обусловленном метастазированием колоректального рака, рака яичников, аппендикса, карциномы поджелудочной железы, желудка. Проникновение препарата через гематоэнцефалический барьер при пероральном введении открывает перспективу его использования для лечения опухолей мозга.

Параметры фармакодинамических эффектов антрафурана, полученные на адекватных опухолевых моделях, могут составить основу для разработки и оптимизации лекарственных средств - производных антрахинонов, а результаты проведенного исследования позволят уточнить стратегию последующего доклинического и клинического исследования препаратов близкой структуры и механизма действия.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что антрафуран высокоэффективен на клинически значимых моделях перевиваемых опухолей мышей и ксенографтах опухоли человека при внутрибрюшинном и пероральном способах применения. Оптимальным является режим ежедневного пятикратного введения в разовых дозах 30 мг/кг (~МПД внутрибрюшинно) и 80 мг/кг (60% от МПД перорально).

2. Установлено, что при внутривенном введении диапазон переносимых и токсических доз антрафурана крайне узок, а при введении переносимых доз препарат противоопухолевого действия не оказывает.

3. Показано, что токсичность при пероральном пути введения уменьшается примерно 10 раз по сравнению с внутрибрюшинным и в 100 раз по сравнению с внутривенным. На основании полученных данных о переносимых и токсических дозах антрафуран отнесен к 3 классу токсичности (умеренно токсичные препараты).

4. Установлено, что причиной смерти при парентеральных путях введения антрафурана является сердечно-сосудистая недостаточность, вызванная нейротоксическим действием препарата. При пероральном применении гибель животных наступает на фоне кишечной и гематологической токсичности.

5. Установлено, что субстанция антрафурана при субхроническом пероральном применении обладает гемато-, нефро-, кардио-, гепато- и гастроинтестинальной токсичностью. В разовой дозе, 5-кратно превышающей терапевтическую, антрафуран вызывает изменения структуры мозга. В разовой дозе, эквивалентной 1 терапевтической, проявления указанных выше видов токсичности менее выражены и полностью обратимы в течение 30 дней.

6. Показаны преимущества антрафурана перед антрациклинами, применяемыми в клинике, по кардиотоксичности, которая проявляется только патоморфологически в виде транзиторной умеренной кардиомиопатии при превышении переносимых доз.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Shchekotikhin A.E., Dezhenkova L.G., Tsvetkov V.B., Luzikov Y.N., Volodina Y.L., Tatarskiy V.V. Jr., Kalinina A.A., Treshalin M.I., Treshalina H.M., Romanenko V.I., Kaluzhny D.N., Kubbutat M., Schols D., Pommier Y., Shtil A.A., Preobrazhenskaya M.N. Discovery of antitumor anthra[2,3-b]furan-3-carboxamides: Optimization of synthesis evaluation of antitumor properties // *Eur. J. Med. Chem.* – 2016. – V.112. – P.114-129.
2. Treshalina H.M., Romanenko V.I., Kaluzhnyb D.N., Treshalin M.I., Nikitin A.A., Tikhomirov A.S., Shchekotikhin A.E. Development and pharmaceutical evaluation of the anticancer Anthrafuran - Cavitron complex, a prototypic parenteral drug formulation // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2017. – V. 109. – P. 631–637.
3. Переверзева Э.Р., Трещалин М.И., Еремкин Н.В., Щекотихин А.Е., Трещалин И.Д. Токсикологическая характеристика нового противоопухолевого мультитаргетного препарата антрафуран // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2017. – Т. 16. – № 4. – С. 79 – 83.
4. Трещалин М.И., Трещалин И.Д., Голибродо В.А., Щекотихин А.Е., Переверзева Э.Р. Экспериментальная оценка токсических свойств ЛХТА-2034 при пероральном применении // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2018. – Т. 17. – №3. – С. 81-88.
5. Трещалин М.И., Неборак Е.В. Топоизомеразы: особенности действия, классификация, клеточные функции, ингибиторы, антрафурандион. Обзор литературы // *Российский онкологический журнал.* – 2018. – Т. 23. – №2. – С. 60-70.
6. Трещалин М.И., Неборак Е.В., Трещалина Е.М. Перспективы поиска мультитаргетных ингибиторов топоизомераз с противоопухолевым действием // *Сибирский онкологический журнал.* – 2019. – V. 18. – № 4. – P. 59-66.

7. Портной Ю.А., Довженко С.А., Кобрин М.Б., Переверзева Э.Р., Трещалин М.И., Голибродо В.А., Щекотихин А.Е., Фирсов А.А. Доклиническая фармакокинетика и острая токсичность антрафурана - нового противоопухолевого средства // Хим.-фарм. журнал. – 2020. – Т. 54. – № 2. – С. 3-7.
8. Shchekotikhin A.E., Treshalina N.M., Treshchalin M.I., Pereverzeva E.R., Isakova N.B., Tikhomirov A.S. Experimental Evaluation of Anticancer efficiency and acute toxicity of anthrafuran for oral administration // Pharmaceuticals. – 2020. – V. 13. – № 5. – P. 81.
9. Treshchalin M.I., Treshalina N.M., Golibrodov V.A., Shchekotikhin A.E., Pereverzeva E.R. Subchronic Toxicity Study of Oral Anthrafuran on Rabbits // Pharmaceuticals. – 2021. – V.14. – P. 00.

Тезисы:

1. Трещалин И.Д., Ерёмкин Н.В., Трещалин М.И., Переверзева Э. Р. Изучение острой токсичности фармацевтической композиции антрафурандиона при различных путях введения // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – Спецвыпуск. – Т. 16. – С. 77.
2. Трещалин И.Д., Щекотихин А.Е., Трещалин М.И., Переверзева Э.Р. Противоопухолевая активность фармацевтических композиций антрафурана на мышах // Материалы XV Всероссийской научно-практической конференции имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы». – Москва, 29-30 марта. – 2018. //Российский биотерапевтический журнал. – Спецвыпуск. – 2018. – Т. 17. – С. 74-75.
3. Treshalin M.I., Pereverzeva E.R., Treshalina N.M., Shekotikhin A.E. Features of the toxic effect of a new multitarget anticancer drug for oral administration // XXXVIII Международная научно-практическая конференция EurasiaScience: Сборник статей. – Москва, 30 июня 2021. – М.: Научно-издательский центр «Актуальность. РФ», 2021. – С. 26-29.
4. Treshalin M.I., Pereverzeva E.R., Treshalina N.M., Shekotikhin A.E. Selection of a candidate for preclinical investigation from the series of cytotoxic derivatives of 5-10-dioxoanthrafuran-3(2)-carboxamides // XXXVIII Международная научно-практическая конференция Advances in science and technology: Сборник статей. – Москва, 15 июня 2021. – М.: Научно-издательский центр «Актуальность. РФ», 2021. – С. 31-33.